



REVISIÓN

Una mirada retrospectiva de la influencia de la aplicación de los sistemas de imagen en los resultados de las técnicas de inyección intracitoplasmática (ICSI)



Santiago González-Reig^a y Juan Manuel Moreno-García^{a,b,*}

^a Cátedra de Biomedicina Reproductiva, Clínica Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

^b Unidad de Reproducción, Clínica Vistahermosa, Alicante, España

Recibido el 2 de junio de 2015; aceptado el 9 de febrero de 2016

Disponible en Internet el 7 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

MSOME;
IMSI;
PolScope;
Fallo de fecundación

Resumen La técnica inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) lleva aplicándose con relativo éxito durante cerca de 25 años. A pesar de los resultados obtenidos, esta está lejos de ser totalmente infalible: se acumulan constantemente pacientes que sufren fallos de fertilización o sucesivos fallos de implantación tras varios ciclos de ICSI. Por ello, en el mercado han aparecido diferentes sistemas de imagen que permiten perfeccionar estas técnicas.

Sin embargo, hasta el momento, estas nuevas tecnologías no han gozado de demasiado éxito. El sistema PolScope (también denominado oosight) permite observar las estructuras internas del ovocito durante los procesos de microinyección. Su aplicación permitiría observar el huso meiótico, evitando que sea dañado durante el progreso de la técnica, pero tiene escaso sentido a la hora de evaluar el gameto. Por otro lado, el sistema *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection* (IMSI) está bastante más desarrollado, pero el tiempo que requiere su manejo, unido a los escasos éxitos obtenidos en su aplicación sobre la población general, ha supuesto un evidente desinterés por parte de los laboratorios de reproducción.

En el presente trabajo se ha realizado un análisis exhaustivo de estas técnicas de imagen y de los resultados obtenidos en los diferentes artículos publicados. El resultado de dicha búsqueda ha revelado que, si bien el uso del sistema *motile-sperm organelle morphology examination* (MSOME) durante los procesos de microinyección no supone una mejora clara de los resultados en la población general, determinados grupos de pacientes con alteraciones espermáticas (teratozoospermia) o con sucesivos fallos de ICSI previos, sí que pueden verse altamente beneficiados de su aplicación. Según las conclusiones desprendidas del presente trabajo, a estos pacientes se les puede, por tanto, ofrecer estas técnicas como alternativa a otros métodos menos accesibles, como por ejemplo la donación de gametos, con cierta garantía de éxito.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lab@vistahermosa.com (J.M. Moreno-García).

KEYWORDS

MSOME;
IMSI;
PolScope;
ICSI failure

A retrospective look at the influence of different imaging systems on ICSI results

Abstract The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique has been implemented with relative success for almost 25 years. Despite the results, it is far from being completely infallible, with an increasing number of patients suffering successive fertilisation or implantation failures after several cycles of ICSI. For this reason, different imaging systems have appeared in the last few years that may help to improve these techniques.

However, these new technologies have not been very successful. The PolScope system (also called oosight) enables most of the internal structures of the egg to be observed during the process of microinjection. Also, with this system the meiotic spindle can be observed, preventing it from being damaged during the process, although it is not of much use when assessing the gamete. On the other hand, the intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) system is perhaps much more developed, but the time required to manage this technique, together with the few number of successful cycles obtained in its application in the general population, has led to an apparent lack of interest by reproduction laboratories.

In this paper, a thorough analysis has been made of these imaging techniques and the results obtained in various published articles. The result of this search has revealed that, although the use of the motile-sperm organelle morphology examination (MSOME) system during the process of microinjection does not show a clear improvement in results when applied in the general population, certain groups of patients with sperm abnormalities (teratozoospermia), or with successive previous failures of ICSI may benefit highly from its application. According to the findings observed in this study, it is possible to offer to these patients some of the techniques described as an alternative to other less accessible methods, such as gamete donation, with some guarantee of success.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en los años 90 del pasado siglo (Palermo et al., 1992) supuso una revolución en las técnicas de reproducción asistida. Gracias a ella, con tan solo un único espermatozoide podemos proceder a fecundar un ovocito, con grandes posibilidades de obtener un embrión, que finalmente curse en embarazo. Sin embargo, el uso de estas técnicas también implica una reducción en la capacidad natural de los gametos de autoseleccionarse, con lo que la responsabilidad de dicho acto pasa al embriólogo. En este punto, es crítico realizar correctamente dicha discriminación, de forma que una mala selección puede echar por tierra la mayoría de las opciones de obtener un embrión evolutivo. A pesar de ello, en la práctica habitual suele trabajarse a relativamente pocos aumentos (apenas 400x), concediendo, tal vez, mayor importancia a realizar el proceso en el menor tiempo posible que a efectuar una selección de los gametos altamente minuciosa. No obstante, aún se considera que hay margen de mejora, y, por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de imagen con el objetivo de mejorar la calidad de nuestros embriones, y, con ello, perfeccionar estos procesos. Algunos de los sistemas desarrollados incluirían: el sistema PolScope (también denominado oosight), centrado en la evaluación del gameto femenino; el Zech-selector, con el que se pretende seleccionar espermatozoides con mayor movilidad y menor grado de fragmentación en su ADN; o el *motile sperm organelle morphology examination* (MSOME),

diseñado en principio para la evaluación del gameto masculino y que ha derivado, posteriormente, hacia su aplicación dentro de la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI), tomando el nombre de *Intracytoplasmic Morphologically-selected Sperm Injection* (IMSI).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la conveniencia de la aplicación de las nuevas tecnologías de imagen, sobre todo, en los momentos previos y durante la aplicación de la técnica de ICSI. Tomando como base una exhaustiva búsqueda bibliográfica, baremaremos los pros y los contras del empleo de estas técnicas, con el ánimo de establecer, en primer lugar, si es posible estandarizar su uso a todos los pacientes. Si el resultado no fuera positivo, es decir, si los estudios realizados no consideraran que puede haber una mejora sustancial en su uso generalizado, pasaremos a valorar si algún grupo de pacientes particular podría beneficiarse preferentemente de su aplicación.

Material y métodos

Para el presente trabajo se ha realizado una revisión de la bibliografía más relevante acerca del estudio y desarrollo, así como de los resultados obtenidos durante la aplicación de las técnicas de imagen durante la ICSI. Principalmente se ha estudiado el sistema MSOME, la técnica IMSI y el PolScope. La base de datos utilizada ha sido el PubMed. La búsqueda de bibliografía se ha acotado al periodo comprendido entre 2006 y 2015 con los términos «MSOME», «IMSI», «Zech-selector», «Oosight», «PolScope», «human sperm vacuoles»

y «high magnification, sperm», así como un estudio de los trabajos previos referidos por estos. Todos los artículos consultados están reflejados en el apartado de bibliografía. Solo se consideraron los trabajos publicados en inglés, los cuales fueron seleccionados, analizados y relacionados con la intención de obtener una visión global de las posibilidades de las técnicas consultadas. Además, se examinan, comparan y discuten las metodologías de estudio y los resultados.

Resultados

Técnicas para la evaluación ovocitaria

Empezaremos hablando de los sistemas de imagen diseñados específicamente para evaluar la calidad ovocitaria. El sistema denominado PolScope (o microscopio de polarización, también conocido comercialmente como oosight) permite evaluar el estado del propio gameto, incluyendo la presencia (o no) de un huso meiótico intacto y en su posición apropiada, o de una zona pelúcida del grosor adecuado (fig. 1); factores que, si se tienen en cuenta durante el proceso de ICSI, podrían aumentar enormemente el número de embriones con aspecto favorable e, incluso, mejorar hasta 8 veces las tasas de embarazo (Cohen et al., 2004; Shen et al., 2005; Son y Tan, 2010; Wang et al., 2001; Zeng et al., 2007).

El oosight permite observar mediante luz polarizada las estructuras internas del ovocito. Si bien las posibilidades de elección del ovocito adecuado son mucho más limitadas que en la selección espermática, en determinados casos sí es posible evaluar la conveniencia del uso de un determinado ovocito o no. Muchos trabajos publicados hacen uso de esta técnica para evaluar diferentes procesos considerados agresivos, pero realizados con frecuencia durante la práctica clínica. Por ejemplo, en ovocitos que habían sufrido un proceso previo de congelación lenta se observó cómo, muchos de ellos, presentaban alteraciones en la forma y disposición del huso meiótico, si bien en el mismo estudio se constató como la mayoría recuperaba su estado normal en apenas una hora de cultivo tras la descongelación (Sereni et al., 2009); de este modo, según los autores, y en lo que respectaba al huso, no sería necesario el cultivo de las 3 h que marca la bibliografía (Bianchi et al., 2005; Rienzi et al., 2004). También se pudo evaluar como ovocitos de ratón procedentes de una estimulación ovárica más suave, producida

por el letrozol, un inhibidor de la aromatasa, presentaban un mejor aspecto interno que aquellos procedentes de estimulaciones con FSH (Ganesh et al., 2010).

Sin embargo, la aplicación más útil de estos sistemas, esto es, su uso durante la fecundación ovocitaria, quedaría limitado a la realización de lo que se denomina ICSI de rescate («rescued ICSI»), o a la realización de una ICSI en ovocitos que no fecundaron tras un intento previo de fecundación *in vitro* (FIV). Estos gametos tienen, al menos, un día de retraso (asincronía en madurez ovocitaria), debido al intento de FIV realizado previamente. Debido a esto, el intento de realizar un ICSI con ellos implicaría la generación de embriones con alto grado de anomalías cromosómicas, baja tasa de embarazo o alta probabilidad de formación de 3 o más pronúcleos, principalmente por la rotura del huso, que se encuentra deslocalizado, durante la inyección (fig. 1). En un reciente estudio comprobaron como la aplicación del oosight permitía reducir el daño al ovocito en este punto y mejorar significativamente las tasas de fertilización respecto al grupo control (69 vs. 44%), reduciendo la formación de embriones con número anormal de pronúcleos (Moon et al., 2013).

Técnicas para evaluar el grado de integridad de ADN espermático

En cuanto al espermatozoide, una de las características que se ha demostrado más crítica a la hora de seleccionar el gameto adecuado durante el proceso de ICSI es poder medir la integridad de su ADN. Sin embargo, las técnicas más usadas en la actualidad para evaluar el nivel de fragmentación en el ADN espermático implican la destrucción del propio espermatozoide (sistemas basados en la *sperm chromatin dispersion*); con lo que la única alternativa que podemos ofrecer en el laboratorio es la obtención de un capacitado enriquecido con espermatozoides con el ADN intacto, sin poder asegurar que el gameto que finalmente seleccionemos sea el adecuado o no. En este punto entra en juego una novedosa técnica denominada «Zech-selector», una cámara que permite la selección espermática sin aplicar estrés por centrifugación, simplemente con su desplazamiento por una superficie durante un corto espacio de tiempo.

Un reciente estudio en el que analizaban un subgrupo de espermatozoides seleccionados mediante esta técnica llegó

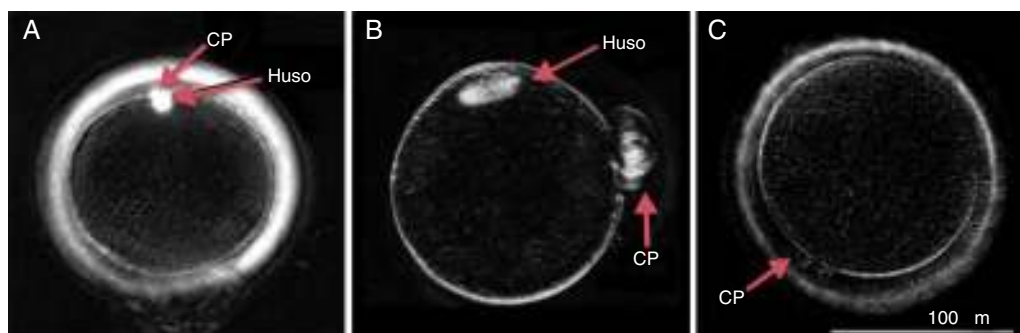


Figura 1 Imágenes obtenidas mediante el sistema PolScope (oosight), en las que es posible observar la disposición del corpúsculo polar (CP), el huso meiótico y el grosor de la zona pelúcida. A) Ovocito normal maduro (Son y Tan, 2010). B) Ovocito que presenta el huso meiótico desplazado (Cheng Hong ©). C) Ovocito sin huso meiótico (Zeng et al., 2007).

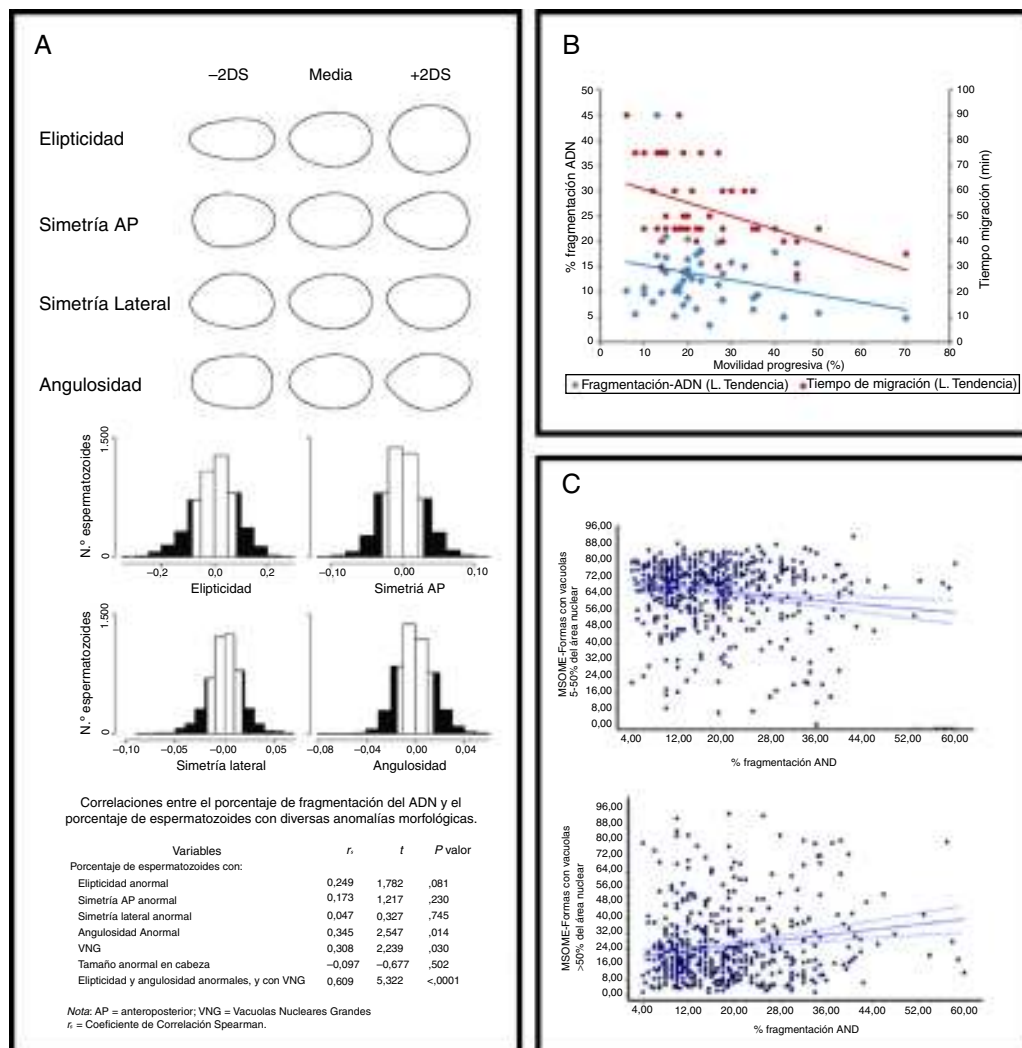


Figura 2 A) Resultados del análisis Fourier realizado sobre las cabezas de los espermatozoides en [Utsuno et al. \(2013\)](#). Muestra la media de cada parámetro analizado, junto con la desviación típica (DE). Los histogramas muestran la distribución de la población respecto a cada parámetro, las desviaciones mostradas en negro serían consideradas formas anormales. B) Correlación entre el porcentaje de espermatozoides que muestran movilidad normal, con su fragmentación en el ADN, y el tiempo de migración en el Zech-selector ([Seiringer et al., 2013](#)). C) Relación entre la fragmentación del ADN y la presencia de vacuolas de pequeño y gran tamaño ([Oliveira et al., 2010](#)).

a la conclusión de que aquellos espermatozoides con peor movilidad eran portadores de anomalías en sus cromosomas, tanto numéricas como estructurales (principalmente en el X, Y y 18). Dicha técnica, además, es eficaz para separar espermatozoides con mayor número de vacuolas o con condensación anómala en su cromatina. De este modo, los espermatozoides que dispongan de una mejor movilidad progresiva serán los que, en definitiva, tengan su ADN intacto y los que finalmente utilizemos a la hora de microinyectar ([Ebner et al., 2003](#); [Seiringer et al., 2013](#)) (fig. 2B).

Factor masculino-sistemas de selección

A día de hoy, la mejor alternativa para aumentar las posibilidades de elegir correctamente el espermatozoide para inyectar es el uso de otro sistema denominado MSOME ([Bartoov et al., 2002](#)), cuya aplicación dentro de las

técnicas de microinyección se denomina IMSI ([Bartoov et al., 2003](#)). Esta técnica se basa en la observación de los gametos mediante un microscopio invertido equipado con un sistema de micromanipulación, en el cual se ha acoplado un novedoso sistema óptico conectado, a su vez, a una cámara y a un sistema digital de imagen. Este sistema permite, en conjunto, un campo de observación de 6.600 aumentos.

Sin embargo, el principal problema al obtener tal nivel de magnificación es decidir qué debemos evaluar. Ante esto, en la bibliografía se presentan diferentes criterios morfológicos para evaluar al espermatozoide en cabeza, acrosoma, pieza intermedia o cola, y para, de algún modo, intentar correlacionar los dismorfismos de estas estructuras con una peor integridad en su ADN ([de Almeida Ferreira Braga et al., 2011](#); [Garolla et al., 2008](#); [Oliveira et al., 2010](#); [Utsuno et al., 2013](#)). Una dificultad añadida es la gran cantidad de formas y tamaños que puede adoptar el esperma humano. Esto complica la definición de criterios de normalidad, así como el

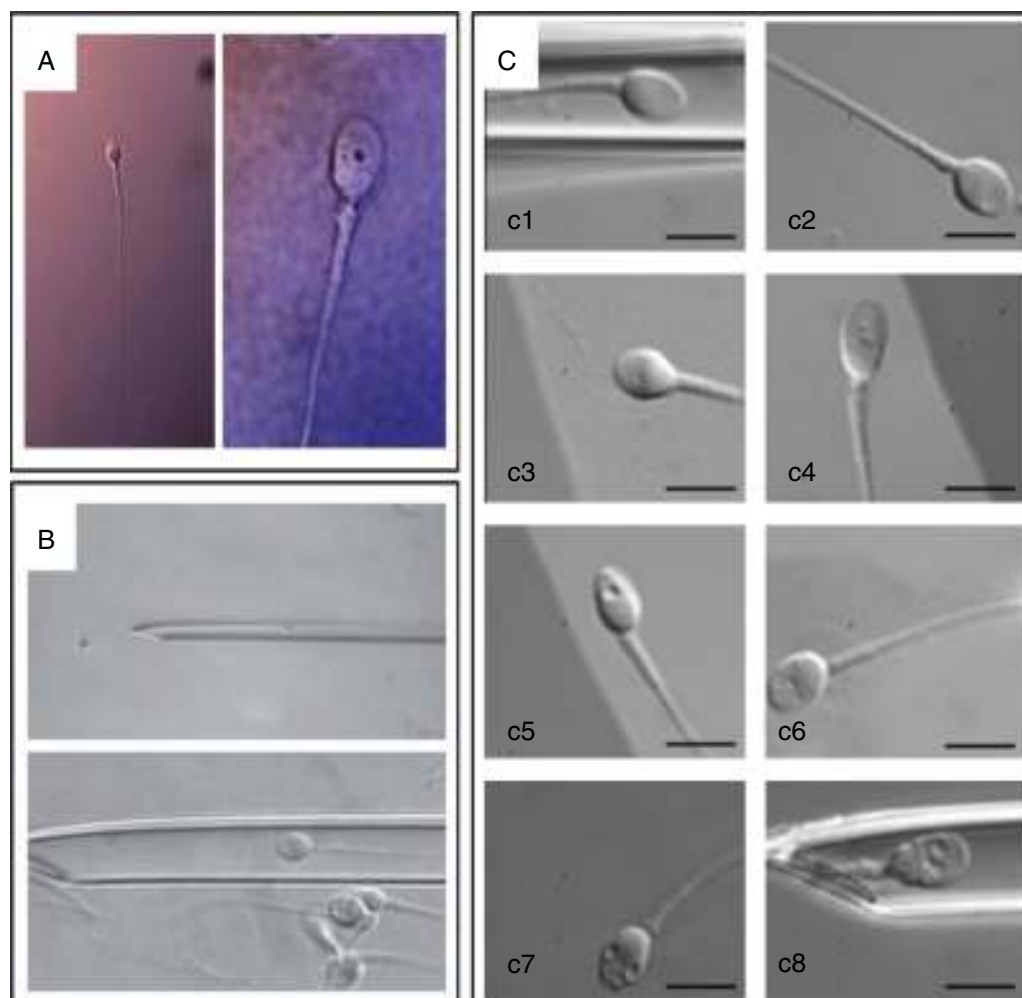


Figura 3 A y B) Muestra la visión de un espermatozoide mediante el sistema óptico convencional (x400) y mediante el sistema MSOME (x6.000) (Antinori et al., 2008). C) Muestra diferentes espermatozoides analizados mediante el sistema MSOME: (c1-c2) sin vacuolas (clase I); (c3-c4) máximo 2 vacuolas pequeñas (clase II); (c5-c6) más de 2 vacuolas pequeñas o una grande (clase III); (c7-c8) varias vacuolas junto anomalías de forma (clase IV). Escala: 5 μ m (Knez et al., 2012).

establecimiento de categorías bien definidas. Criterios morfológicos que relacionan largo, ancho o circunferencia se pueden aplicar, pero muchas veces no resultan demasiado adecuados, ya que las proporciones no suelen coincidir entre diferentes muestras (Oliveira et al., 2010; Utsuno et al., 2013) (fig. 2A).

En uno de sus trabajos, Oliveira nos demuestra cómo durante las técnicas convencionales de selección en ICSI, y usando criterios morfológicos Tygerberg, se produce una elección ficticia de espermatozoides calificados como de buena calidad (falsos positivos). El uso del MSOME es mucho más restrictivo y permite identificar vacuolas y evaluar anomalías en la cromatina que, de otro modo, quedarían ocultas (Oliveira et al., 2009). Por otro lado, el estudio de Knez et al. (2012) va un paso más allá y nos muestra como la inyección de espermatozoides con menos de 2 vacuolas pequeñas implica la obtención de embriones de mejor calidad y con mayores posibilidades de desarrollarse a blastocisto. En cambio, los propios autores ya nos advierten de que esta selección tan exhaustiva solo puede realizarse con la capacidad de aumentos ofrecida por el MSOME.

Significado biológico de las vacuolas

Como vemos, el uso de la técnica MSOME nos abre un nuevo mundo en el análisis del gameto masculino. Sin embargo, en la comunidad científica todavía existe cierto desconocimiento sobre algunas de las estructuras que encontramos en los gametos humanos. Una de estas estructuras, cuya presencia produce cierta controversia, son las vacuolas (Bartoov et al., 2003, 2001; Berkovitz et al., 2006b; Berkovitz et al., 2005; Vanderzwalmen et al., 2008) (fig. 3). Tras la introducción de las técnicas de microscopía electrónica en los años 50 del pasado siglo, se pudo comprobar como la presencia de vacuolas estaba ampliamente extendida en las muestras de semen analizadas, y eso llevó a la conclusión de que su existencia podría ser una característica inherente en el espermatozoides tanto humano como de otros mamíferos (Chrzanowski, 1966; Fawcett, 1958; Pedersen, 1969), y que estaban, de algún modo, relacionadas con los procesos de descondensación de la cromatina (Czaker, 1985). Actualmente, sin embargo, diferentes autores comienzan a considerar que la presencia de estas estructuras puede ser síntoma de una baja calidad

espermática (Bartoov et al., 2003, 2002, 2001; Berkovitz et al., 2006b; Berkovitz et al., 2005; Janett et al., 2001; Mundy et al., 1994): son de peor pronóstico aquellos espermatozoides con un gran número de ellas o que presentan, al menos, una de gran tamaño (Knez et al., 2012; Oliveira et al., 2010; Toshimori, 2009; Vanderzwalmen et al., 2008) (fig. 3C).

Algunos primeros estudios ya confirmaban la presencia de una mayor concentración de espermatozoides con vacuolas de gran tamaño en individuos subfértiles (Mundy et al., 1994) o relacionaban la presencia de estas estructuras con una baja fertilidad, incluso en sementales equinos (Janett et al., 2001). Más recientemente, se ha comenzado a relacionar una menor tasa de embarazo en aquellos pacientes que, tras ser tratados mediante ciclos de ICSI, presentaban un semen con mayor número de espermatozoides afectados con vacuolas (Bartoov et al., 2003, 2001; Berkovitz et al., 2006b; Berkovitz et al., 2005; Vanderzwalmen et al., 2008).

Sin embargo, a pesar de estos estudios, la significación de estas vacuolas aún no está del todo clara. En otro estudio que comparaba la fecundidad de espermatozoides con vacuolas grandes frente a espermatozoides sin ellas o con vacuolas pequeñas, no fue posible establecer diferencias en las tasas de fecundidad o desarrollo a blastocisto entre los grupos analizados, así como tampoco determinar que dichas cifras fueran diferentes respecto a las obtenidas mediante una menos exhaustiva selección espermática por ICSI convencional (Tanaka et al., 2012). Sin embargo, muy posiblemente, el resultado de este estudio puede haberse visto afectado por el limitado número de muestras analizadas. Además, otro reciente estudio nos indica que la presencia de vacuolas no reduce las posibilidades de fecundidad, considerando esta como la tasa de recién nacido vivo, y que, en definitiva, su presencia no altera la calidad del esperma (Fortunato et al., 2015).

Una buena parte de la gran discrepancia existente podría venir del desconocimiento respecto a estas estructuras. Algunos autores consideran que las vacuolas son un indicio de la presencia de daño en el ADN espermático, lo cual influiría claramente en su capacidad fecundante (Bartoov et al., 2002). Estos argumentan dicho origen en que la inducción artificial de la reacción acrosómica no altera la presencia de estas vacuolas, las cuales continúan visibles en el núcleo. Además, con la observación de espermatozoides en diferentes estadios madurativos, llegan a la conclusión de que estas tienen su origen durante el proceso de maduración de los espermatozoides (Tanaka et al., 2012). Recientemente, una extensa revisión bibliográfica, ofrecida por Boitrelle y otros autores, concluye que estas vacuolas son de origen nuclear y que están conectadas con la presencia de fallos en la condensación de la cromatina, y correlacionadas, en algunos casos, con daños en el ADN presente en el esperma (Boitrelle et al., 2013).

Sin embargo, otros autores argumentan firmemente que el origen de las vacuolas es acrosomal. Entre este último grupo se encuentran Kacem et al. (2010), los cuales cuestionan que la posición de dichas vacuolas pueda ser establecida simplemente con el uso de un sistema MSOME de «tan solo» 6.600 aumentos. Entre los argumentos que exponen se encuentra el hecho de que, ya en estudios previos, se estableció que era necesario el uso de microscopía electrónica para la correcta identificación de estas estructuras, unos

20.000 aumentos (Zamboni, 1987), además de que la microscopía de óptica presenta limitaciones a la hora de observar estructuras intracitoplasmáticas. Estos autores consideran que las vacuolas se localizan mayoritariamente en la región anterior de la cabeza, relacionadas posicionalmente con el acrosoma, y que es poco probable que no exista relación entre ambas estructuras (Kacem et al., 2010). Además, establecen un sistema para detectar mediante fluorescencia aquellos espermatozoides que han concluido su reacción acrosómica, y comparan espermatozoides entre MSOME y microscopía electrónica. Con estos instrumentos lanzan la idea de que aquellos espermatozoides considerados en la bibliografía como «sin vacuolas» mediante el MSOME son en realidad espermatozoides que han concluido su reacción acrosómica y que están mejor preparados para llevar a cabo la fecundación, y su uso es la razón de que se mejoren las tasas de fecundación en estos trabajos (Kacem et al., 2010).

Finalmente, todos estos experimentos no están libres de críticas. Neyer et al. consideran que mediante métodos convencionales no es posible observar exactamente el mismo espermatozoide y que, por tanto, no se puede determinar si sus vacuolas desaparecen en realidad tras la inducción de la reacción acrosómica. Para solventar esto desarrollan un sistema de microcanales, los cuales permiten observar los mismos espermatozoides antes y después de ser sometidos a diferentes tratamientos (Neyer et al., 2013). Este novedoso sistema les permite aseverar que el origen de las vacuolas no puede achacarse a la manipulación en el laboratorio (por temperatura o por estrés oxidativo), ni que una completa reacción acrosómica genere la desaparición de las vacuolas. Su conclusión final es que, muy probablemente, el origen de las vacuolas pueda establecerse durante la espermiogénesis, al igual que indica el anterior grupo de autores (Tanaka et al., 2012); aunque dejan la puerta abierta a la de tesis de Toshimori, quien considera que no todas las vacuolas son iguales, y que las vacuolas de mayor tamaño son especialmente negativas para la viabilidad del embrión. Según este grupo, es necesario abrir, en primer término, el debate para definir claramente qué consideramos vacuolas «negativas», para, posteriormente, establecer las implicaciones en la capacidad fecundante de los espermatozoides que las poseen (Toshimori, 2009). En la misma línea encontramos el trabajo de Oliveira et al. (2010), quienes lograron correlacionar la existencia de grandes vacuolas con una mayor fragmentación en el ADN espermático, correlación esta que es menos clara con las vacuolas de tamaño reducido (fig. 2C).

Aplicación práctica de los nuevos sistemas de imagen

Existe escasa discusión sobre el hecho de que una correcta selección del espermatozoide mejora los resultados durante los procesos de microinyección convencionales (de Vos et al., 2003; Kahraman et al., 1999; Miller y Smith, 2001); sin embargo, existe alta controversia sobre el uso de nuevas tecnologías que permitan la observación más minuciosa del gameto, lo que, *a priori*, debería mejorar dicha selección.

La principal desventaja que alegan los autores para la aplicación de estas técnicas en general, y de la técnica de IMSI en particular, es la gran cantidad de tiempo que implica

Tabla 1 Cuadro resumen de los resultados obtenidos en los artículos analizados en el presente trabajo

Publicación	Criterio selección de parejas	Factor masculino	N.º parejas	Resultados			
Fallos de ICSI previos							
				Valor	IMSI %	ICSI %	p-valor
Bartoov et al., 2003	Más de 2 fallos de ICSI previos	Sí	100	Embarazos	66	30	<0,01
				Abortos	9	33	<0,01
				Partos	60	20	<0,01
Hazout et al., 2006	Más de 2 fallos de ICSI previos	-	125	Embarazos	38	2	<0,01
				RNV	18	0	<0,01
Klement et al., 2013	Al menos 1 fallo de ICSI previo	Sí	449	Embarazos	56	38	0,002
				Partos	28	18	0,04
Mauri et al., 2010	Estudio en embriones		331 (embriones)	Tasa fertilización	70,9	70,4	<0,05
				Embriones aptos D+2	57,8	52,2	<0,05
Oliveira et al., 2011	Más de 2 fallos de ICSI previos	No	200	Embarazos	26	19	NS
				Abortos	15	32	-
				RNV	21	12	NS
EL khattabi et al., 2013	Más de 2 fallos de ICSI previos	Sí	220	Embarazos	24	26	NS
				RNV	21	22	NS
Alteraciones severas en factor masculino							
				Valor	IMSI %	ICSI %	p-valor
Antinori et al., 2008	Sin selección inicial	Sí	139	Embarazos	30	12	0,02
				Abortos	17	38	-
Balaban et al., 2011	Parejas sin fallos de ICSI previos	Sí	168	Embarazos	54	44	NS
				RNV	44	38	NS
Knez et al., 2012	Estudio en embriones	Sí	1.000 (embriones)	Tasa fertilización	60	64	-
				Embriones a morula	31	13	<0,05
				Embriones a blastocisto	21	24	<0,01
De Vos et al., 2013	Parejas sin fallos de ICSI previos	Sí	340	Embarazos	48	24	<0,05
				Embarazos	34	37	NS

su uso (Antinori et al., 2008). Durante el IMSI, por ejemplo, en primer lugar es necesario aislar el espermatozoide en una zona alejada del resto, para evaluar después su morfología y decidir si es válido o no. Además, en el punto de la evaluación encontramos un escollo que durante las técnicas de ICSI no nos planteamos, y que consiste en elegir qué debemos evaluar. Como indicamos antes, existe un amplio debate sobre qué elementos se deben evaluar durante las técnicas de microinyección con microscopios de gran aumento, y, aun con los avances logrados, no estamos seguros de qué estructuras debemos considerar anómalas y cuáles no. Como hemos destacado anteriormente, algunos estudios han pretendido introducir algunas bases para la evaluación rutinaria de la forma de la cabeza durante los procesos de IMSI (Oliveira et al., 2010; Utsuno et al., 2013).

En cualquier caso, a pesar de las evidentes desventajas, en la bibliografía encontramos diferentes estudios que intentan evaluar la conveniencia del uso de estas nuevas técnicas, principalmente durante la selección espermática (pueden consultarse algunas revisiones al respecto (Ebner et al., 2014; Boitrelle et al., 2014; Setti et al., 2013; Souza Setti et al., 2010). Estos estudios se centran, sobre todo, en aquellos casos en los que existen sucesivos fallos de ICSI previos, o bien alteraciones severas en los recuentos espermáticos (oligoastenoteratozoospermia). También hay estudios que intentan evaluar la utilidad de estas técnicas en parejas que no han entrado en ciclos de FIV previos, como una alternativa en aquellos países con limitaciones legales en la generación de embriones para transferir.

Sin embargo, el uso de IMSI frente a las técnicas ICSI convencionales resulta para algunos autores beneficiosa, mientras que para otros no supone una ventaja clara (El Khattabi et al., 2013; Mauri et al., 2010; Oliveira et al., 2010), aunque estos trabajos presentan algunas discrepancias estadísticas (Tabla 1). Por ejemplo, El Khattabi considera que se mejoran algo los resultados sobre pacientes afectados por teratozoospermia, pero no en la población

general (El Khattabi et al., 2013). Mauri, en cambio, solo considera que existe un similar desarrollo de embriones obtenidos mediante ambas técnicas hasta día +2, sin analizar los desarrollos posteriores (Mauri et al., 2010). Esto supone una clara limitación para el trabajo, ya que actualmente se considera que el desarrollo embrionario durante los primeros días se encuentra guiado principalmente por el material genético contenido en el ovocito, sin que afecte el supuesto ADN dañado del espermatozoide (Berger et al., 2011; de Almeida Ferreira Braga et al., 2011; Tesarik, 2005), lo que explica que embriones de estadio de 4-8 células afectados con graves alteraciones cromosómicas tengan un aspecto morfológico normal.

Los primeros estudios en los que se planteaba el uso de la tecnología MSOME durante los procesos de microinyección (IMSI), se centraban en su aplicación en parejas que habían sufrido más de 2 fallos de ICSI (Bartoov et al., 2003; Hazout et al., 2006). Estas parejas son consideradas como de muy mal pronóstico, ya que tras 2 fallos de ICSI las posibilidades de que logren concebir en un siguiente intento son extremadamente bajas (Stolwijk et al., 2000) y son, en muchos casos, derivadas a ciclos de ovodonación. Sin embargo, en ambos estudios, los resultados fueron altamente satisfactorios, con duplicación de las tasas de embarazo frente a la técnica de ICSI convencional (30 vs. 66%) (Bartoov et al., 2003), o con mejora clara del pronóstico de estas parejas con unas tasas de recién nacidos vivos de alrededor del 18% (vs. 0% en el fallo de ICSI previo) (Hazout et al., 2006) (Tabla 1). Ambos estudios son bastantes concluyentes, si bien estábamos ante parejas con escasas posibilidades de éxito *a priori*, ante lo cual cualquier ayuda en sus ciclos, aunque tan solo fuera un aumento en los tiempos de selección del gameto adecuado, podría resultar positivo. De hecho, en el primer trabajo nos encontramos con que el grupo al que se le aplicó ICSI convencional logró un sorprendente 30% en la tasa de embarazo (Bartoov et al., 2003), un porcentaje bastante alto para ser parejas con más de 2 fallos de ICSI previos. Los

autores achacan este resultado a un diagnóstico incompleto, y tal vez pesimista, de las parejas masculinas introducidas en el estudio; aunque también podría ser achacable a un mayor cuidado en la selección espermática al estar siendo esta evaluada a través de un estudio científico. Adicionalmente, Oliveira presentó un estudio en el que detectó que la aplicación de IMSI en este tipo de parejas permitía obtener unas tasas de embarazo mayores y unas tasas de abortos menores (Oliveira et al., 2011); sin embargo, debido al bajo número de parejas analizadas, los resultados no pudieron considerarse significativos (Tabla 1).

A estos estudios podemos sumar el trabajo más reciente de Klement et al., en el que observan claramente una mejora en las tasas de embarazos mediante el uso del IMSI en parejas incluso con tan solo un fallo de ICSI previo; sin embargo, en sus estudios también observan que el pronóstico para aquellas parejas que no consiguen embarazo tras aplicarles IMSI resulta extremadamente negativo (Klement et al., 2013) (Tabla 1).

No obstante, las parejas que más se podrían beneficiar de estas técnicas son aquellas afectadas por alteraciones severas en el factor masculino. En una situación con un limitado número de espermatozoides, o con una alta incidencia de malformaciones en estos, una mejor selección espermática puede suponer una evidente ventaja y, *a priori*, una mejora en los resultados. Antinori et al. realizaron un amplio estudio en el que compararon los resultados de aplicar estas técnicas en grupos de pacientes afectados por oligoastenoteratozoospermia, en un principio sin tener en cuenta el número de fallos de ICSI previos y posteriormente considerando tan solo aquellos que habían presentado más de 2 fallos previos de ICSI (Antinori et al., 2008). En primer lugar, realizaron un estudio piloto para evaluar cuál era el número mínimo de parejas que debían analizar para obtener unas cifras estadísticamente significativas.

Realizaron, por tanto, el estudio con un total de 446 parejas, afectadas por factor masculino (oligoastenoteratozoospermia) exclusivamente, con al menos 3 años de esterilidad y con parejas femeninas de menos de 35 años. Posteriormente, dividieron las parejas en 2 grupos, y aplicaron a uno de ellos ICSI y al otro IMSI. De este modo, observaron un ligero aumento en las tasas de embarazo en aquellas parejas a las que se aplicó la técnica IMSI frente a las que se realizó ICSI convencional. Además, constataron un incremento en las tasas de embarazo e implantación en todos los subgrupos de IMSI, pero especialmente en aquellas parejas que habían tenido 2 o más fallos de ICSI, en concordancia con otros estudios anteriores (Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2006a; Berkovitz et al., 2006b; Berkovitz et al., 2005; Hazout et al., 2006) (Tabla 1). Sin embargo, en este trabajo tan solo se microinyectan 3 ovocitos por pareja, debido a que el número de embriones máximo que se pueden obtener en cada ciclo se encontraba restringido por la ley italiana. Si bien es cierto que en todo estudio científico se deben instaurar unas reglas previas, que incluyen el establecer un mismo número de ovocitos fecundados para cada una de las parejas del estudio, el limitado número de embriones obtenidos por dicha restricción pudo reducir claramente las posibilidades de transferencia de embriones de buen aspecto y, con ello, generar un sesgo negativo en los resultados de ICSI mostrados. Esto que, en definitiva, podría ser un lastre para el estudio, no le resta utilidad en esce-

narios legales restrictivos similares a los planteados, pero resulta incierto en situaciones como la española donde la obtención de embriones no se encuentra limitada. En nuestro país, la posibilidad de seleccionar entre mayor número de embriones tal vez podría haber mejorado las tasas de embarazo-implantación de las parejas tratadas mediante ICSI convencional, igualándolas, al menos en parte, a las obtenidas por las parejas sometidas al IMSI.

Por otro lado, los mismos autores plantean que las diferencias entre la aplicación de ambas técnicas no fueron estadísticamente significativas teniendo en cuenta tan solo a las parejas sin fallos previos de ICSI, posiblemente por el bajo número de casos analizados. En este sentido, puede ser útil el estudio planteado por Balaban et al. (2011), en el que intentan analizar si el uso de IMSI puede ayudar a pacientes que generalmente acuden a técnicas de FIV, es decir, si resultaría útil la aplicación de esta técnica en sustitución directa de la ICSI convencional, un escenario similar al planteado con las parejas sin fallos previos de ICSI del estudio de Antinori. Comenzaron el estudio con 181 pacientes, divididos directamente en 2 grupos (uno para ICSI y otro para IMSI), sin plantearse si habían sufrido fallos previos ni el tipo de dolencias que padecían (factor femenino, masculino o mixto). Posteriormente, durante el análisis estadístico, sí consideraron que aproximadamente la mitad de las parejas a las que se les aplicó cada técnica sufrían alteraciones del factor masculino y que, en definitiva, eran estas las más beneficiadas por el uso de IMSI. Respecto a las parejas con otras dolencias, las tasas de implantación-embarazo fueron algo mayores en el grupo de IMSI, si bien las diferencias no pudieron considerarse estadísticamente significativas (Tabla 1); un resultado similar al obtenido más recientemente por de Vos et al. (2013), que aseveran que el IMSI no debería aplicarse de rutina en parejas sin fallos previos. Todas estas conclusiones hacen plantearnos la conveniencia de emplear IMSI como técnica de rutina, si bien, sí que podría ser de utilidad en casos de alteraciones severas del factor masculino. En estos casos la inyección de ovocitos con espermatozoides alterados puede llevarnos a obtener un número bastante alto de embriones, pero estos, muy probablemente, tendrán una escasa calidad y, al final, no serán transferidos; sin embargo, la aplicación de una selección más exhaustiva con IMSI, aunque más lenta, podría generarnos menos embriones, pero de una mayor calidad y con más posibilidades de éxito.

Knez et al. (2012) nos plantean un escenario similar, tomando en cuenta parejas con teratozoospermia y centrándose exclusivamente en la evaluación de un gran número de embriones, alrededor de 1.000. Su estudio fue doble. Por un lado, compararon las tasas de embriones que llegaban a estadio de mórula entre 2 grupos estadísticamente similares, pero a los que se les aplicaba ICSI o IMSI, respectivamente. En este caso, aunque no observaron diferencias apreciables en las tasas de fecundación, sí que comprobaron como aquellos embriones obtenidos por IMSI tenían menores tasas de detención, sobre todo en estadios tempranos (Tabla 1). Por otro lado, comprobaron como la selección y posterior inyección de espermatozoides de peor calidad (con más de 2 pequeñas vacuolas o, al menos, una de gran tamaño, ambas con una supuesta peor integridad en el ADN, fig. 3C) suponía defectos en el desarrollo embrionario, en estadios muy tempranos (a nivel de pronúcleos) y en

el desarrollo de blastocisto. Estos embriones sufrían, además, cierto retraso madurativo y mayores tasas de bloqueo embrionario, lo que podría considerarse una evidencia práctica de que la presencia de grandes vacuolas puede correlacionarse con mayor fragmentación en el ADN. A pesar de que de Vos et al. (2013) cuantifican la prevalencia de espermatozoides con vacuolas en apenas el 27,5% en muestras seminales normales, lo que, según estos mismos autores, supone una baja probabilidad de elegir un espermatozoide afectado durante una técnica de ICSI convencional, no es posible negar que una mejor selección espermática en las técnicas de microinyección es una garantía de éxito y, en este caso, el uso de una mayor magnificación permite observar la presencia de anomalías, principalmente vacuolas, que en técnicas de ICSI convencionales son imposibles de detectar.

Discusión

Las técnicas de inyección citoplasmática de espermatozoides hicieron su aparición hace apenas 25 años: fueron desde un principio una revolución en los tratamientos de reproducción asistida (Palermo et al., 1992). Desarrolladas en sus inicios como una técnica para tratar problemas de obstrucción en las trompas, actualmente se consideran la primera opción cuando una pareja es derivada hacia un ciclo de FIV, gracias a sus altas posibilidades de éxito (Palermo et al., 2000). Sin embargo, estas técnicas se encuentran lejos de ser infalibles, lo que deja margen para el estudio y aplicación de nuevas tecnologías de imagen en su despliegue.

En el presente trabajo hemos realizado una exhaustiva recopilación bibliográfica que nos permite evaluar las posibilidades que nos brindan estas nuevas tecnologías. Evidentemente, como toda nueva técnica tiene sus pros y sus contras, y difícilmente se puede encontrar una tecnología que sea aplicable por igual a todas las parejas.

El sistema oosight podría tener un gran potencial durante el desarrollo del ICSI. Tener la capacidad de observar el estado madurativo del ovocito y localizar perfectamente sus estructuras internas (sobre todo el huso meiótico) puede suponer una ventaja a la hora de obtener un embrión viable (fig. 1). Sin embargo, su aplicación práctica estaría limitada a evitar dañar el ovocito durante el desarrollo de la técnica, en aquellos casos en los que el huso puede encontrarse desplazado de su posición normal (junto al primer corpúsculo polar), como puede ser en ovocitos procedentes de ciclos de congelación-descongelación, en determinados protocolos de estimulación o en mujeres de edad avanzada (Ganesh et al., 2010; Sereni et al., 2009). Esto es así ya que la selección de ovocitos no tiene demasiado sentido, dado que su número durante los ciclos de TRA suele ser bastante limitado.

Por otro lado, el desarrollo del IMSI supone, *a priori*, un buen avance dentro de la FIV. Con la técnica ICSI se trabaja a una magnificación relativamente baja, la cual es muy práctica para la manipulación de los gametos, pero que resulta claramente insuficiente a la hora de realizar una selección exhaustiva de los espermatozoides válidos para la inyección. A estos aumentos, la mayoría de las estructuras subcelulares permanecen ocultas (fig. 3), realizándose, la mayoría de veces, una selección mínima, basada exclusivamente en que el espermatozoide conserva una movilidad correcta o en que

tiene un aspecto relativamente normal. Sin embargo, con la capacidad de aumento del sistema MSOME (Bartoov et al., 2003), sí que es posible observar las estructuras celulares, principalmente vacuolas, lo que *a priori* debería mejorar la capacidad de selección, e incluso detectar anomalías que de otro modo quedarían ocultas (Oliveira et al., 2009).

Pero tanta capacidad de aumentos ¿resulta práctica? En principio parece que no: el trabajo con estos aumentos supone una minuciosa selección de los espermatozoides y su aislamiento individual, lo que implica consumir demasiado tiempo en el proceso. A continuación, se microinyectan de un modo similar a la técnica de ICSI convencional, pero, en cualquier caso, la aplicación del IMSI puede retrasar el trabajo rutinario del laboratorio y, con ello, puede surgir la necesidad de adquirir un segundo equipo de microinyección o un mayor gasto en personal.

Esta inversión deshabilita el uso del IMSI de manera rutinaria, y limita su aplicación a algunas parejas concretas, como aquellas afectadas por deficiencias severas en el factor masculino (Balaban et al., 2011). En estos casos, se podrían estar seleccionando espermatozoides con anomalías ocultas, y esta elección deficiente de gametos para la inyección podría llevarnos a obtener una cohorte de embriones de baja calidad, lo que en definitiva podría generar un fallo de implantación. Tal vez, en estos casos, sería preferible alargar sensiblemente el proceso, con la obtención de un número algo más limitado de embriones, pero de visiblemente mejor calidad (Knez et al., 2012).

Por otro lado, podríamos considerar que el mantenimiento de embriones no supone gasto, pero esto no es del todo cierto. Mantener embriones que finalmente no van a prosperar o que tienen pocas posibilidades de hacerlo puede suponer bastantes miles de euros de pérdidas a lo largo del año, en incubadores, medios de cultivo, etc. Debemos, por tanto, poner en una balanza si queremos invertir más tiempo en la selección espermática y en personal, o si elegimos obtener y cuidar el máximo de embriones posible para posteriormente seleccionarlos. Esto solo podemos planteárnoslo en países donde la ley de reproducción asistida es suficientemente permisiva. En países donde el número máximo de embriones que se pueden obtener por ciclo y paciente está estrictamente limitado, la nueva tecnología de IMSI cobra más sentido.

En otro escenario se encuentran parejas que ya han sufrido sucesivos fallos de ICSI. Las razones de estos fallos pueden ser varias, aunque un gran número de ellos se debe a la presencia de una baja calidad espermática (una combinación de espermatozoides con formas anómalas o alto grado de fragmentación en su ADN, con la presencia de vacuolas), unido muchas veces a la obtención de un bajo número de ovocitos en estado madurativo óptimo. *A priori*, muchos de estos problemas podrían solucionarse con el uso del oosight, o con una selección de espermatozoides más exhaustiva, con detección de la presencia de vacuolas o formas sutilmente anómalas, sobre todo en la cabeza (Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2006a; Berkovitz et al., 2006b; Berkovitz et al., 2005; Hazout et al., 2006; Klement et al., 2013).

En conclusión, las nuevas tecnologías aplicadas a las TRA deben ser evaluadas con cautela. Los escasos trabajos clínicos encontrados en los que aplican el PolScope sobre grupos de pacientes hacen pensar que el principal sentido práctico del oosight se limita a evitar el daño al ovocito. Por otro

lado, según los estudios realizados, el avance de la técnica de IMSI es capaz de mejorar los resultados en TRA, si bien, su mayor potencial se alcanza únicamente en algunos casos en los que una mejor selección espermática resulta crucial. Y es en estas situaciones, que se escapan de la norma, en las que cualquier ayuda extra puede ser positiva. Así, estamos de acuerdo con otros autores que abogan por presentar el IMSI a pacientes que ya hayan sufrido al menos 2 fallos de ICSI, o que posean un alto porcentaje de fragmentación de ADN espermático, pero nunca establecerlo como rutina (Ebner et al., 2014).

Otro asunto es el hecho de si estamos seleccionando correctamente los gametos durante estos procesos. A pesar de todos nuestros esfuerzos, aún nos queda muchísimo por aprender acerca de nuestro proceso reproductivo: no sabemos a ciencia cierta qué significación biológica tiene la presencia de vacuolas en nuestro espermatozoide, o cuál es el límite funcional en una forma anómala de un espermatozoide, o por qué se producen desplazamientos del huso meiótico en el ovocito frente a determinados procesos. El despejar estos interrogantes puede resultar secundario en la aplicación diaria de la técnica ICSI, cuando simplemente priorizamos los resultados, pero puede ser crucial en determinados casos aislados, como en parejas con fallos recurrentes de ICSI, en los que existe cierto grado de teratozoospermia oculta bajo la escasa magnificación de nuestros instrumentos rutinarios. Y, por supuesto, el desconocimiento de estos interrogantes limita enormemente las capacidades de unas técnicas cuyo éxito se basa justamente en tener estos conceptos totalmente claros.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

El siguiente artículo no ha recibido financiación específica de ninguna institución y se ha realizado dentro de las actividades académicas establecidas en el Máster Universitario en Medicina y Genética Reproductivas a través de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la colaboración en la revisión del siguiente artículo a los Dres. José Jesús López Gálvez y Joaquín Rueda Puente, directores de la Cátedra de Biomedicina Reproductiva Clínica Vistahermosa-Universidad Miguel Hernández.

Bibliografía

- Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., d' Angelo, D., et al., 2008. *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: A prospective randomized trial*. *Reproductive Biomedicine Online* 16, 835–841.
- Balaban, B., Yakin, K., Alatas, C., Oktem, O., Isiklar, A., Urman, B., 2011. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: A prospective randomized study. *Reproductive Biomedicine Online* 22, 472–476, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.11.003>
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., 2001. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *The New England Journal of Medicine* 345, 1067–1068, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200110043451416>
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H., et al., 2003. *Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection*. *Fertility and Sterility* 80, 1413–1419.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y., Barak, Y., 2002. *Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome*. *Journal of Andrology* 23, 1–8.
- Berger, D.S., Abdelhafez, F., Russell, H., Goldfarb, J., Desai, N., 2011. Severe teratozoospermia and its influence on pronuclear morphology, embryonic cleavage and compaction. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 9, 37, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-9-37>
- Berkovitz, A., Eltes, F., Ellenbogen, A., Peer, S., Feldberg, D., Bartoov, B., 2006a. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Human Reproduction (Oxford, England)* 21, 1787–1790, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del049>
- Berkovitz, A., Eltes, F., Lederman, H., Peer, S., Ellenbogen, A., Feldberg, B., et al., 2006b. *How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection*. *Reproductive Biomedicine Online* 12, 634–638.
- Berkovitz, A., Eltes, F., Yaari, S., Katz, N., Barr, I., Fishman, A., et al., 2005. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, 185–190, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh545>
- Bianchi, V., Coticchio, G., Fava, L., Flamigni, C., Borini, A., 2005. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, 1078–1083, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh736>
- Boitrelle, F., Guthauser, B., Alter, L., Bailly, M., Bergere, M., Wainer, R., et al., 2014. High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: Confirmed and potential indications. *Reproductive Biomedicine Online* 28, 6–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.09.019>
- Boitrelle, F., Guthauser, B., Alter, L., Bailly, M., Wainer, R., Vialard, F., et al., 2013. The nature of human sperm head vacuoles: A systematic literature review. *Basic and Clinical Andrology* 23, 3, <http://dx.doi.org/10.1186/2051-4190-23-3>
- Chrzanowski, S., 1966. *Ultrastructure of human spermatozoon*. *Polish Medical Journal* 5, 482–491.
- Cohen, Y., Malcov, M., Schwartz, T., Mey-Raz, N., Carmon, A., Cohen, T., et al., 2004. Spindle imaging: A new marker for optimal timing of ICSI? *Human Reproduction (Oxford, England)* 19, 649–654, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh113>
- Czaker, R., 1985. *On the origin of nuclear vacuoles in spermatozoa a fine structural and cytochemical study in mice*. *Andrologia* 17, 547–557.

- De Almeida Ferreira Braga, D.P., Setti, A.S., Figueira, R.C., Nichi, M., Martinhago, C.D., Iaconelli Jr., A., et al., 2011. Sperm organelle morphologic abnormalities: Contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 78, 786–791, <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2011.06.018>
- De Vos, A., van de Velde, H., Bocken, G., Eysenbosch, G., Franceus, N., Meersdom, G., et al., 2013. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction* (Oxford, England) 28, 617–626, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/des435>
- De Vos, A., van de Velde, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., van Steirteghem, A., 2003. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 79, 42–48.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M., et al., 2003. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Human Reproduction* (Oxford, England) 18, 2406–2412.
- Ebner, T., Shebl, O., Oppelt, P., Mayer, R.B., 2014. Some reflections on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection. *International Journal of Fertility & Sterility* 8 (2), 105–112.
- El Khattabi, L., Dupont, C., Sermondade, N., Hugues, J.-N., Poncelet, C., Porcher, R., et al., 2013. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure? *Fertility and Sterility* 100, 62–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.048>
- Fortunato, A., Boni, R., Leo, R., Nacchia, G., Liguori, F., Casale, S., et al., 2015. Vacuoles in sperm head are not associated with head morphology, DNA damage and reproductive success. *Reproductive Medicine Online* 32 (2), 154–161.
- Fawcett, D.W., 1958. The structure of the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology* 7, 195.
- Ganesh, A., Chattopadhyay, R., Narendra Babu, K., Chakravarty, B., Chaudhury, K., 2010. Analysis of spindle characteristics and embryo quality in mice stimulated with letrozole using Polscope imaging. *Fertility and Sterility* 93, 1477–1481, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.045>
- Garolla, A., Fortini, D., Menegazzo, M., De Toni, L., Nicoletti, V., Moretti, A., et al., 2008. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reproductive Biomedicine Online* 17, 610–616.
- Hazout, A., Dumont-Hassan, M., Junca, A.-M., Cohen Bacrie, P., Tesarik, J., 2006. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 12, 19–25.
- Janett, F., Thun, R., Ryhiner, A., Burger, D., Hassig, M., Hertzberg, H., 2001. Influence of Eqvalan (ivermectin) on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 55, 785–792.
- Kacem, O., Sifer, C., Barraud-Lange, V., Ducot, B., de Ziegler, D., Poirot, C., et al., 2010. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reproductive Biomedicine Online* 20, 132–137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.10.014>
- Kahraman, S., Akarsu, C., Cengiz, G., Dirican, K., Sözen, E., Can, B., et al., 1999. Fertility of ejaculated and testicular megalothal spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* (Oxford, England) 14, 726–730.
- Klement, A.H., Koren-Morag, N., Itsykson, P., Berkovitz, A., 2013. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus intracytoplasmic sperm injection: A step toward a clinical algorithm. *Fertility and Sterility* 99, 1290–1293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.020>
- Knez, K., Tomazevic, T., Zorn, B., Vrtacnik-Bokal, E., Virant-Klun, I., 2012. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reproductive Biomedicine Online* 25, 168–179, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.011>
- Mauri, A.L., Petersen, C.G., Oliveira, J.B., Massaro, F.C., Baruffi, R.L., Franco Jr., J.G., 2010. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 150, 42–46, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.01.004>
- Miller, J.E., Smith, T.T., 2001. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Human Reproduction* (Oxford, England) 16, 918–924.
- Moon, J.H., Son, W.-Y., Henderson, S., Mahfoudh, A., Dahan, M., Holzer, H., 2013. Spindle examination in unfertilized eggs using the polarization microscope can assist rescue ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 26, 280–285, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.10.019>
- Mundy, A.J., Ryder, T.A., Edmonds, D.K., 1994. Morphometric characteristics of motile spermatozoa in subfertile men with an excess of non-sperm cells in the ejaculate. *Human Reproduction* (Oxford, England) 9, 1701–1704.
- Neyer, A., Vanderzwalmen, P., Bach, M., Stecher, A., Spitzer, D., Zech, N., 2013. Sperm head vacuoles are not affected by in-vitro conditions, as analysed by a system of sperm-microcapture channels. *Reproductive Biomedicine Online* 26, 368–377, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.021>
- Oliveira, J., Massaro, F., Mauri, A., Petersen, C., Nicoletti, A., Baruffi, R., et al., 2009. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reproductive Biomedicine Online* 18, 320–326, [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60088-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60088-0)
- Oliveira, J.B.A., Cavagna, M., Petersen, C.G., Mauri, A.L., Massaro, F.C., Silva, L.F., et al., 2011. Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 9, 99, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-9-99>
- Oliveira, J.B., Massaro, F.C., Baruffi, R.L., Mauri, A.L., Petersen, C.G., Silva, L.F., et al., 2010. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertility and Sterility* 94, 1937–1940, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.042>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18.
- Palermo, G.D., Neri, Q.V., Hariprasad, J.J., Davis, O.K., Veeck, L.L., Rosenwaks, Z., 2000. ICSI and its outcome. *Seminars in Reproductive Medicine* 18, 161–169, <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-12555>
- Pedersen, H., 1969. Ultrastructure of the ejaculated human sperm. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* (Vienna, Austria: 1948) 94, 542–554, 1948.
- Rienzi, L., Martinez, F., Ubaldi, F., Minasi, M.G., Iacobelli, M., Tesarik, J., et al., 2004. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Human Reproduction* (Oxford, England) 19, 655–659, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh101>
- Seiringer, M., Maurer, M., Shebl, O., Dreier, K., Tews, G., Ziehr, S., et al., 2013. Efficacy of a sperm-selection chamber in terms of morphology, aneuploidy and DNA packaging. *Reproductive Biomedicine Online* 27, 81–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.03.013>
- Sereni, E., Sciajno, R., Fava, L., Coticchio, G., Bonu, M.A., Borini, A., 2009. A PolScope evaluation of meiotic spindle dynamics in frozen-thawed oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 19, 191–197.

- Setti, A.S., Paes de Almeida Ferreira Braga, D., Iaconelli Jr., A., Aoki, T., Borges Jr., E., 2013. Twelve years of MSOME and IMSI: A review. *Reproductive Biomedicine Online* 27, 338–352, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.011>
- Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U., Tinneberg, H.-R., 2005. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)* 20, 1596–1606, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh811>
- Son, W.-Y., Tan, S.L., 2010. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Human Reproduction Update* 16, 675–689, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmq014>
- Souza Setti, A., Ferreira, R.C., Paes de Almeida Ferreira Braga, D., de Cássia Sávio Figueira, R., Iaconelli Jr., A., Borges Jr., E., 2010. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: A meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online* 21, 450–455, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.017>
- Stolwijk, A.M., Wetzels, A.M., Braat, D.D., 2000. Cumulative probability of achieving an ongoing pregnancy after in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection according to a woman's age, subfertility diagnosis and primary or secondary subfertility. *Human Reproduction (Oxford, England)* 15, 203–209.
- Tanaka, A., Nagayoshi, M., Tanaka, I., Kusunoki, H., 2012. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertility and Sterility* 98, 315–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.034>
- Tesarik, J., 2005. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 370–375.
- Toshimori, K., 2009. Dynamics of the mammalian sperm head: Modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 204, 5–94.
- Utsuno, H., Oka, K., Yamamoto, A., Shiozawa, T., 2013. Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity. *Fertility and Sterility* 99, 1573–1580.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.100
- Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A., Stecher, A., et al., 2008. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reproductive Biomedicine Online* 17, 617–627.
- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Keefe, D.L., 2001. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Human Reproduction (Oxford, England)* 16, 1464–1468.
- Zamboni, L., 1987. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: The role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility* 48, 711–734.
- Zeng, H., Ren, Z., Yeung, W.S., Shu, Y., Xu, Y., Zhuang, G., et al., 2007. Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22, 1681–1686, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dem070>